



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 43 09 248 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 43 09 248.9  
㉒ Anmeldetag: 23. 3. 93  
㉔ Offenlegungstag: 29. 9. 94

㉕ Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**B 01 J 20/06**  
B 01 J 20/08  
B 01 J 20/10  
C 07 H 21/00  
C 12 N 9/22  
C 12 N 9/16  
C 12 N 11/14  
// C 07 H 21/02, 21/04,  
B 01 J 20/30

DE 43 09 248 A 1

㉗ Anmelder:

Lorenz, Bernd, 6500 Mainz, DE; Marmé, Stefan, 6500 Mainz, DE; Unger, Klaus, Prof. Dr., 64342 Seeheim-Jugenheim, DE; Schröder, Heinz C., Prof. Dr. Dr., 65189 Wiesbaden, DE; Müller, Werner E. G., Prof. Dr., 65203 Wiesbaden, DE

㉘ Erfinder:

gleich Anmelder

㉙ Modifikation von Metalloxiden mit Polyphosphaten oder ähnlichen Verbindungen und ihre Anwendung

㉚ Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von polyphosphatmodifizierten amorphen anorganischen porösen oder nichtporösen Grundmaterialien, wie Zirkonium(IV)-oxid, und seine Verwendung zur Reinigung und Immobilisierung von (i) Nukleinsäuren und (ii) Proteinen.

DE 43 09 248 A 1

## Beschreibung

Anorganische poröse oder nichtporöse Grundmaterialien, wie Zirkonium(IV)-oxid, Titan(IV)-oxid, Silicium(IV)-oxide oder Aluminium(III)-oxide, werden an die weiter unten beschriebenen Liganden (wie z. B. Polyphosphate) gekoppelt. Anschließend wird das zu trennende Gemisch da zugegeben und die selektive Trennung angeschlossen.

Oder: Anorganische poröse oder nichtporöse Grundmaterialien, wie Zirkonium(IV)-oxid, Titan(IV)-oxid, Silicium(IV)-oxide oder Aluminium(III)-oxide, werden zunächst in z. B. eine Säule gefüllt und anschließend ein Gemisch aus der (den) zu trennenden Substanz(en) mit den Liganden (wie z. B. Polyphosphate) dazugegeben. Anschließend erfolgt die Trennung.

Die erste Variante liefert in der Regel bessere Ergebnisse.

## 1. Beschreibung der Herstellung der Matrices

## Prinzip

An anorganische poröse oder nichtporöse Grundmaterialien, wie Zirkonium(IV)-oxid, Titan(IV)-oxid, Silicium(IV)-oxide oder Aluminium(III)-oxide werden die weiter unten beschriebene Liganden (wie z. B. Polyphosphate) gekoppelt.

## Beispiele

Die Verfahren zur Herstellung der folgenden Matrices, z. B. zur Anwendung als Säulenmaterial für die Reinigung von noch zu beschreibenden Biomolekülen, können weitgehend nach dem gleichen Prinzip durchgeführt werden. Poröses oder nichtporöses Zirkonium(IV)-oxid fungiert unter anderem als Grundmaterial an das folgende Liganden gekoppelt werden können: Polyphosphate verschiedener Kettenlänge; Mischungen von Polyphosphaten verschiedener Kettenlänge mit Orthophosphat und/oder Pyrophosphat; Metaphosphaten; Mischungen von Polyphosphaten verschiedener Kettenlänge, Orthophosphat, Pyrophosphat mit Metaphosphaten; andere anorganische Polyanionen und andere Verbindungen mit freien Phosphatgruppen z. B. Nukleosidphosphate.

## Beispiel I für die o.g. Modifizierung der Kopplungsprodukte

Es seien hier nur die Versuche dargelegt, die zur Belegung von Zirkonium(IV)-oxid mit Polyphosphaten/Polyphosphorsäuren durchgeführt wurden. Im Beispiel wurde als Grundmaterial ein poröses Zirkonium(IV)-oxid mit einem mittleren Teilchendurchmesser von  $100 \pm 30 \mu\text{m}$  und einer spezifischen Oberfläche von  $6 \text{ m}^2/\text{g}$  verwendet.

Die Modifizierung wurde mit einem Gemisch aus Polyphosphaten mit 13 bis 18 Phosphateinheiten (Sigma;  $\text{Na}_{15}\text{P}_{13}\text{O}_{40}$ — $\text{Na}_{20}\text{P}_{18}\text{O}_{55}$ ) im Batch-Verfahren durchgeführt. Hierzu wurde eine Suspension von üblicherweise 5 g des anorganischen Oxids in 100 ml bidestilliertem Wasser hergestellt. Zu dieser Suspension wurde in Parallelansätzen Polyphosphat zugegeben: Für die Menge des oben beschriebenen Batchansatzes lag die Einwaage an Polyphosphaten bei üblicherweise 0,1 bis 1 g. Die Ansätze wurden gewöhnlich bei  $303^\circ\text{K}$  ( $30^\circ\text{C}$ ) in einem Wasserbad geschüttelt. Die Standzeit betrug üblicherweise 12 Stunden (als übliche Reaktionszeit wurde 3 bis 50 Stunden ausgewählt). Die Synthese kann in einem weiten pH-Bereich erfolgen. Das modifizierte Zirkonium(IV)-oxid wurde abfiltriert und bei  $353^\circ\text{K}$  ( $80^\circ\text{C}$ ) getrocknet. Der Gewichtsanteil des gebundenen Polyphosphates an der hergestellten Matrix [Zirkonium(IV)-oxid] beträgt in der Regel 0,2—1%.

## Beispiel II für die o.g. Modifizierung der Kopplungsprodukte

Die oben erwähnte Grundsubstanz Zirkonium(IV)-oxid wurde wiederum benutzt. Die Modifizierung wurde mit Trinatriumtrimetaphosphat (Sigma  $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ ) ebenfalls im Batch-Verfahren durchgeführt. Hierzu wurde eine Suspension von üblicherweise 5 g des anorganischen Oxids in 100 ml bidestilliertem Wasser hergestellt. Zu dieser Suspension wurde in den Ansätzen Trimetaphosphat hinzugegeben.

Für die Menge des oben beschriebenen Batchansatzes lag die Einwaage an Trimetaphosphaten bei üblicherweise 0,2 bis 3 g. Die Ansätze wurden gewöhnlich bei  $303^\circ\text{K}$  ( $30^\circ\text{C}$ ) in einem Wasserbad geschüttelt. Die Standzeit betrug üblicherweise 12 Stunden. Das modifizierte Zirkonium(IV)-oxid wurde abfiltriert und bei  $353^\circ\text{K}$  ( $80^\circ\text{C}$ ) getrocknet. Der Gewichtsanteil des gebundenen Trimetaphosphates an der hergestellten Matrix [Zirkonium(IV)-oxid] beträgt in der Regel 0,2—1%.

## 2. Anwendung der oben aufgeführten Matrices zur Reinigung von Makromolekülen

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß ich die oben aufgeführten Matrices zur effektiven Reinigung von einer Reihe von Biomolekülen eingesetzt werden können.

## Beispiel 1. Bindung und Elution von Nukleinsäuren

## Beispiel 1.1: RNA (Ribonukleinsäure)

Der Versuch wurde im Batch-Verfahren unter Verwendung von Bäckerhefe-Ribonukleinsäure [RNA] (Boehringer-Mannheim) durchgeführt. Ausgangskonzentration: 20–30 µg RNA/ml in einem 30 mM Tris/HCl Puffer (pH 7,6).

#### Durchführung des Versuches

5

Für diese Experimente wurde 0,1 g der polyphosphatmodifizierten Matrix eingesetzt.

Die Menge an gebundener bzw. eluierter RNA wurde über die Bestimmung der Extinktion des Überstandes bei 260 nm ermittelt. Nach den nun im folgenden angeführten Schritten wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen. Die Meßwerte sind in der Tabelle zusammengefaßt. Zwei Parallelexperimente (bezeichnet mit I und II) sind in der Tabelle aufgeführt.

10

#### Schritt 1.

Bestimmung der Extinktionen der Ausgangslösungen bei 260 nm (vor Zugabe zu der Matrix) [Ausgangsextinktionswert]: 0,598 bzw. 0,591.

15

#### Bestimmung der Parameter zur Bindung und die Bindeeffizienz

Zunächst wurde die obige Lösung der RNA zur Matrix hinzugegeben:

20

#### Schritt 2.

Zugabe von 200 µl RNA-Lösung zu 0,1 g Matrix-Material; anschließend kurz und leicht schütteln und 5–10 Minuten zentrifugieren. Die Extinktion verbleibt bei Experiment I: 0,588 [bei Experiment II: 0,580]; hieraus ist zu schließen, daß die RNA noch nicht an die Matrix gebunden hat.

25

#### Schritt 3.

Zugabe von MgCl<sub>2</sub> (Endkonz. 10 mM), schütteln, zentrifugieren. Die Extinktion sinkt im Überstand auf einen Wert von 0,001 [0,009]; hieraus ist zu schließen, daß die RNA in beiden Experimenten vollständig an die Matrix gebunden hat. Neben Mg-Ionen sind auch andere mehrwertige Kationen zur Bindung geeignet.

30

Der Anteil der gebundenen RNA beträgt nahezu 100%.

#### Bestimmung der Parameter zur Desorption der RNA von der Matrix

35

#### Schritt 4.

Zunächst Überstand von Schritt 3 verwerfen und waschen mit 200 µl Puffer.

40

#### Schritt 5.

Überstand verwerfen, Zugabe von 200 µl Puffer mit Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA] (Endkonzentration 10 mM); die Extinktion des Überstandes nimmt wieder zu; Extinktionswerte 0,403 [0,399]. Dieser Effekt ist auf die Desorption der RNA zurückzuführen. Da die RNA aber noch nicht vollständig eluiert wurde, wird erneut mit obigem Puffer mit EDTA gewaschen.

45

#### Schritt 6.

Wiederholung von Schritt 5. Die Extinktion betrug nun 0,112 [0,121].

50

#### Schritt 7.

Wiederholung von Schritt 5. Die Extinktion betrug jetzt 0,047 [0,073]. Somit konnte die RNA nahezu vollständig eluiert werden; Experiment I: 68% + 19% + 8% = 95% [II: 69% + 21% + 12% = 102%] (bei der Streuung der Experimente von ca. 10% liegen diese Werte bei nahezu 100%).

55

#### Ergebnis

Dieser Versuch zeigt überzeugend, daß die in diesem Beispiel angewandte Matrix zur Bindung von Ribonukleinsäure über zweiwertige Kationen geeignet ist. Weiterhin ist gezeigt worden, daß unter Verwendung von EDTA die Nukleinsäure nahezu vollständig zurückgewonnen werden kann.

60

65

## Meßwerte

Schritt Nr.	Extinktion bei 260 nm	
	I	II
1.	0,598	0,591
2.	0,588 (keine RNA gebunden)	0,580
3.	-0,001 (RNA vollständig gebunden)	0,009
4.	-0,006	-0,001
5.	0,403 (68% bzw.	0,399 69% eluiert)
6.	0,112 (19% bzw.	0,121 21% eluiert)
7.	0,047 (8% bzw.	0,073 12% eluiert)

Der Nullabgleich bei den Schritten 1 bis 4 erfolgte gegen den Puffer 30 mM Tris/HCl (pH 7,6), bei den Schritten 5 bis 7 enthielt dieser Puffer noch die entsprechende Konzentration an EDTA (10 mM). Die nach Schritt 3 entstehende Volumenveränderung ist vernachlässigbar (< 1%).

## Bestimmung der maximalen Bindekapazität der Matrix für die ausgewählte Nukleinsäure

Als Ergebnis wurde gefunden, daß bei einer Mg-Ionen-Konzentration von 10 mM maximal 150 µg RNA/g Matrix-Material und bei einer Konzentration von 100 mM maximal 420 µg RNA/g Matrix gebunden werden.

## Beispiel 1.2: DNA (Desoxyribonukleinsäure)

Die Experimente wurden entsprechend den vorher beschriebenen (RNA) durchgeführt.  
 DNA (hergestellt aus Heringssperma nach R.K. Zahn et al.; Biochem. Z. 336: 281—298, 1962; Charakteristika: doppelsträngig, hochmolekular; Reinheit > 98%).  
 Einzelsträngige DNA wurde durch Erhitzen der angeführten doppelsträngigen DNA in 30 mM Tris-HCl (pH 7,6) auf 90°C (für 10 Minuten) und anschließendem schnellen Abkühlen bei -20°C erhalten.

## Meßwerte

Schritt Nr.	Extinktion bei 260 nm		
	Doppelstrang-DNA	Einzelstrang-DNA	
1.	0,260	0,252	5
2.	0,247	0,249	10
3.	0,251 (keine Bindung)	0,067 (73% gebunden)	
4.		0,008	15
5.		0,107 (59% eluiert)	
6.		0,062 (29% eluiert)	20
7.		0,024 (13% eluiert)	25

## Ergebnis

Diese Experimente zeigen:

1. Doppelsträngige DNA bindet nicht an die Matrix. Der Matrix wurde eine DNA-Lösung mit einer Extinktion von 0.260 zugesetzt; sowohl in Abwesenheit von Mg-Ionen (= Schritt 2) [Extinktion: 0.247] als auch bei Anwesenheit von Mg-Ionen [Extinktion: 0.251] wurde eine Extinktion im Überstand gemessen, die im Streubreich liegt.

2. Einzelsträngige DNA bindet ebenfalls nicht bei Abwesenheit von Mg-Ionen (Schritt 2) an die Matrix; jedoch nach Zugabe von Mg- oder anderen mehrwertigen Kationen bindet die zugesetzte DNA zu mehr als 70%. Berücksichtigt man, daß nach oben beschriebener Herstellungsmethode für einzelsträngige DNA der Anteil der renaturierten, d. h. doppelsträngigen DNA 20% beträgt, und die optische Dichte einzelsträngiger DNA um etwa 60% höher ist als die doppelsträngiger, kann man feststellen, daß einzelsträngige DNA zu über 85% an die Matrix bindet. Die Elution ist mit EDTA möglich.

In weiteren Untersuchungen wurde gefunden, (i) daß auch für RNA-Oligomere, RNA-Monomere, einzelsträngige DNA-Oligomere, DNA-Monomere, teilweise einsträngiger "overhang"-DNA sowie (ii) für Verbindungen, die mindestens zwei der folgenden funktionellen Gruppen besitzen: Hydroxyl-, Amino-, Imino- oder verwandte Gruppen wie Thiol- oder Guanidino-Gruppen (z. B. auch andere Zucker als Ribose oder Desoxyribose-Derivate), über eine Komplexbildung mit Metallionen die Bindung an die Matrix möglich ist.

## Beispiel 2. Bindung und Elution von Proteinen

Überraschenderweise wurde ebenfalls gefunden, daß sich die oben aufgeführten Matrices zur effektiven Reinigung einer Reihe von weiteren Biomolekülen (wie z. B. auch Proteine) einsetzen lassen.

## Grundprinzip

Die Bindung von Proteinen kann (i) einerseits direkt (kationische Proteine oder ligandspezifische [also z. B. solche, die eine spezifische Affinität zu Polyphosphaten zeigen] Proteine) oder (ii) indirekt durch Komplexbildung mit zweiwertigen Metall-Kationen erfolgen. Eine Elution kann z. B. mit einem Ionenstärkegradienten oder durch eine pH-Änderung erreicht werden.

## Beispiel 2.1: Ribonuklease A (RNase A)

Bei der RNase A handelt es sich um ein kationisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 9,1.

Die Experimente wurden einmal im Batch-Verfahren und zum anderen mittels der "high performance liquid chromatography" (HPLC)-Methode durchgeführt. Bei beiden Verfahren wurde wiederum die polyphosphatmodifizierte Matrix verwendet.

## 2.1.1. Batch-Verfahren

## Beispiel

Ausgangskonzentration an RNase A [aus Rinderpankreas] (Boehringer-Mannheim): 300–500 µg/ml in einem 100 mM Phosphat-Puffer pH 6.

#### Durchführung

5

##### Schritt 1.

Bestimmung der Ausgangsextinktion bei 280 nm (Wert für Experiment I: 0,312 [Wert für Experiment II: 0,312]).

10

##### Bindung an die Matrix.

##### Schritt 2.

15 Zugabe von 200 µl RNase-Lösung zu 0,1 g Matrix. Die Suspension wurde 2 Minuten geschüttelt, anschließend zentrifugiert (10000 × g; 5 Minuten bei Raumtemperatur). Der Überstand wurde photometrisch gemessen (I: 0,033 [II: 0,044]).

##### Schritt 3.

20

Waschen mit obigem Phosphat-Puffer. Nach diesen Schritten waren bei Experiment I 84% des Proteins gebunden, bei Experiment II: 81% gebunden.

##### Elution von der Matrix.

25

##### Schritt 4.

Waschen mit obigem Phosphat-Puffer, der 2 mol/l NaCl enthielt. Ein Extinktion von 0,194 [0,206] wurde gemessen.

30

##### Schritt 5.

Wiederholung des Schrittes 4 Extinktion von 0,039 [0,044] wurde gemessen.

Demnach wurde bei Experiment I 89% (74% + 15%) und bei Experiment II 98% (81% + 17%) des aufgetragenen Proteins wiedergewonnen.

35

#### Meßwerte

##### Extinktion bei 280 nm

40

Schritt Nr.	I	II
1.	0,312	0,312
2.	0,033	0,044
3.	0,018 84% wurden gebunden	0,015 81%
4.	0,194 74% des gebundenen Proteins wurde eluiert	0,206 81%
5.	0,039 15% wurden eluiert	0,044 17%

55

60

#### Ergebnis

1. RNase A bindet zu über 80% an die Matrix bei pH 6;

2. Elution gelang mit einer Ausbeute von über 90% mit einem Puffer, der 2M NaCl enthielt.

65

#### 2.1.2. HPLC-Verfahren

Es kam eine Anlage der Firma GYNKOTEC mit HPLC-Pumpe 300 CS, Gradienten-Former 250B, UV

Detektor SP 6, zum Einsatz.

Die Säule hatte die Dimensionen:  $250 \times 4,6$  mm.

Dosiervolumen : 20 µl RNase A (2 mg/ml).

Detektion: UV 280 nm.

Säulentemperatur: 20°C.

Packungsmaterial: Polyphosphat-modifiziertes Zirkonium(IV)-oxid, wie im Batch-Verfahren angewandt.

Es wurden zwei verschiedene Systeme für die Bindung und Elution der RNase entwickelt:

#### System I

#### System I

Flußrate  
Äquilibriumierung

0,8 ml/min  
Puffer A

Folgende Puffersysteme wurden verwandt:

Puffer A: 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0)

Puffer B: 100 mM Phosphat-Puffer pH 6,0, der 2 M NaCl enthielt.

#### Programm

Laufzeit	Puffer
0—10 min	100% A
10—40 min	Gradient von 100% A → 100% B
40—50 min	Gradient von 100% B → 100% A

#### Ergebnis

Die Retentionszeit bei diesem System beträgt für die RNase A 21 Minuten.

Hieraus ist zu erkennen, daß die RNase A mit Puffer A an die Matrix bindet und mittels Ionenstärkegradienten wieder eluiert werden kann.

Die Ausbeuten bei diesem Verfahren lagen bei > 80%.

#### System II

#### System II

Flußrate  
Äquilibriumierung

1,5 ml/min  
Puffer A

Folgende Puffersysteme wurden verwandt:

Puffer A: 30 mM Tris/HCl pH 8,0

Puffer B: 30 mM Tris/HCl pH 8,0, die 2 M NaCl enthielt.

#### Programm

Laufzeit	Puffer
0—8 min	100% A
8—23 min	Gradient von 100% A → 50% A : 50% B
23—28 min	Gradient von 50% A : 50% B → 100% A

#### Ergebnis

Die Retentionszeit bei diesem System beträgt für die RNase A 17 Minuten.

Daraus kann man wiederum ableiten, daß die RNase A mit Puffer A an die Matrix bindet und mittels Ionenstärkegradienten eluiert werden kann.

Die Ausbeute bei diesem Verfahren lag bei > 85%.

#### Beispiel 2.2: Desoxyribonuklease I (DNase I)

Die DNase I hat einen isoelektrischen Punkt (pI) von 4,7 bis 5,0 und ist somit bei pH 5 neutral.

## 2.2.1 Batch-Verfahren

## Beispiel

5 Ausgangskonzentration an DNase I aus Rinderpankreas: 200— 400 µg/ml (Boehringer-Mannheim)

## Durchführung

10 Diese Versuche wurden entsprechend dem unter Kapitel 2.1.1. aufgezeigten Verfahren durchgeführt. Zwei Unterschiede wurden eingeführt: (i) Als Startpuffer wurde 100 mM Ammoniumacetat pH 5.0 (anstelle von 100 mM Phosphat-Puffer, pH 6) gewählt; (ii) als Elutionspuffer kam zum Einsatz: 100 mM Tris/HCl pH 7,6 (anstelle von 100 mM Phosphat-Puffer, pH 6; 2 M NaCl).

15 Schritt	Extinktion bei 280 nm	
	I	II
1.	0,398	0,397
20 2.	0,190 70%	0,200 68% gebunden
3.	0,002	0,021
25 4.	0,139 39%	0,141 39% des gebundenen Proteins wurde eluiert
30 5.	0,073 20% wurden eluiert	0,069 19%
35 6.	0,035 10% wurden eluiert	0,031 8%

## Ergebnis

- 40 1. DNase I bindet bei pH 5 zu etwa 70% an das Material;  
 2. Elution gelang mit Puffern, die einen pH-Wert > 6 haben: bei dem hier gezeigten Beispiel (Elution mit 100 mM Tris/HCl pH 7,6) lag die Ausbeute bei über 70%.

## 2.2.2. HPLC-Verfahren

Die Daten für das Gerät, sowie die Detektion, Säule, Säulentemperatur, Packungsmaterial wurden unter Kapitel 2.1.2. gegeben.

50 Bei diesem Beispiel wurde 20 µl DNase (2,5 mg/ml) injiziert.  
 Es wurden wieder zwei verschiedene Systeme verwandt.  
 Die Flußrate war bei beiden Systemen: 0,8 ml/min

## System I

55 Folgende Puffer wurden verwandt:  
 Puffer A: 100 mM Ammoniumacetat pH 5  
 Puffer B: 100 mM Ammoniumacetat pH 6  
 Äquilibrierung wurde mit Puffer A vorgenommen.

## Programm

60 Laufzeit	Puffer
0— 10 min	A
65 10— 20 min	B



## Ergebnis

Die Retentionszeit betrug in diesem Falle 15 Minuten. Daraus ist zu erkennen, daß bei pH 5.0 die Bindung erfolgte, d. h. die DNase besitzt eine spezifische Affinität zum Liganden. Die Elution wurde durch Erhöhung des pH-Wertes erreicht.

5

Die Ausbeute bei diesem Verfahren lag bei > 55%

## System II

Folgende Puffersysteme wurden verwendet:

10

Puffer A: 100 mM Phosphat-Puffer pH 5

Puffer B: 100 mM Phosphat-Puffer pH 6

Äquilibrierung erfolgte mit Puffer A.

## Programm

15

Laufzeit

Puffer

0—10 min

A

10—20 min

B

20

## Ergebnis

Die Retentionszeit betrug in diesem Falle ebenfalls 15 Minuten.

Daraus ist zu erkennen, daß bei pH 5.0 wieder die Bindung erfolgte. Die Elution wurde durch Erhöhung des pH-Wertes erreicht.

25

Die Ausbeute bei diesem Verfahren lag höher als bei System I; Werte von > 70% wurden erzielt.

Die Ausbeuten konnten mit Puffern noch höherer pH-Werte weiter gesteigert werden.

## Beispiel 2.3: Alkalische Phosphatase

30

Die alkalische Phosphatase besitzt einen isoelektrischen Punkt (pI) von 4,4 und ist somit bei pH-Werten > 4,4 ein anionisches Protein.

Bei diesem Beispiel soll nur das HPLC-Verfahren wiedergegeben werden.

Gerät, Detektion, Säule, Säulentemperatur, Packungsmaterial sind im Kapitel 2.1.2. angegeben.

35

In diesen Beispielen wurden jeweils 20 µl (1 mg/ml) alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer-Mannheim) injiziert.

Die Flußrate betrug 1,5 ml/min.

Im ersten System wurde mit einem Puffer von 30 mM Tris/HCl (pH 8) äquilibriert. Nach der Injektion der Probe wurde als Eluent dieser Puffer weiter angewandt. Nach 2 min wurde die alkalische Phosphatase eluiert, d. h. sie wurde kaum retardiert.

40

## Ergebnis

Die alkalische Phosphatase bindet somit unter diesen Bedingungen nicht oder nur schwach an die Matrix.

45

Im zweiten System wurde mit folgendem Puffer äquilibriert und anschließend als Eluent verwendet: 30 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

Die alkalische Phosphatase wurde in diesem System vollständig retardiert.

## Ergebnis

50

Das hier vorgestellte Beispiel zeigt, daß bei Anwesenheit von Magnesiumionen in genanntem Puffer eine vollständige Bindung der alkalischen Phosphatase zu erzielen war.

## Patentansprüche

55

1. Herstellung von Matrices, die als Basis amorphe anorganische poröse oder nichtporöse Grundmaterialien, wie z. B. Zirkonium(IV)-oxid, besitzen, welche mit Polyphosphaten verschiedener Kettenlänge modifiziert wurden.

2. Herstellung von Matrices, die als Basis amorphe anorganische poröse oder nichtporöse Grundmaterialien, wie z. B. Zirkonium(IV)-oxid, besitzen, welche mit Polyphosphaten verschiedener Kettenlänge und mit Orthophosphat und/oder Pyrophosphat im Gemisch modifiziert wurden.

60

3. Herstellung von Matrices, die als Basis amorphe anorganische poröse oder nichtporöse Grundmaterialien, wie z. B. Zirkonium(IV)-oxid, besitzen, welche mit Metaphosphaten verschiedener Kettenlänge modifiziert wurden.

65

4. Herstellung von Matrices, die als Basis amorphe anorganische poröse oder nichtporöse Grundmaterialien, wie z. B. Zirkonium(IV)-oxid, besitzen, welche mit Metaphosphaten verschiedener Kettenlänge und mit Polyphosphaten verschiedener Kettenlänge und/oder Orthophosphat bzw. Pyrophosphat im Gemisch mo-

difiziert wurden.

5. Herstellung von Matrices, die als Basis amorphe anorganische poröse oder nichtporöse Grundmaterialien, wie z. B. Zirkonium(IV)-oxid, besitzen, welche mit anderen anorganischen Polyanionen modifiziert wurden.

6. Herstellung von Matrices, die als Basis amorphe anorganische poröse oder nichtporöse Grundmaterialien, wie z. B. Zirkonium(IV)-oxid, besitzen, welche mit anderen Verbindungen, die freie Phosphatgruppen besitzen (z. B. Nucleosidphosphaten) modifiziert wurden.

7. Verwendung der unter 1—6 aufgeführten Matrices zur Reinigung und Immobilisierung von Nukleinsäuren.

8. Verwendung der unter 1—6 aufgeführten Matrices zur Reinigung und Immobilisierung von Proteinen.

9. Verwendung der unter 1—6 aufgeführten Matrices zur Reinigung und Immobilisierung von Substanzen, bei denen die Bindung zu den unter 1—6 aufgeführten Matrices über Kationen vermittelt wird.